

明細書

凝集抑制作用を有するシヌクレイン変異体

技術分野

5 本発明は、新規なヒト α シヌクレイン変異体に関する。

背景技術

α シヌクレインは140残基からなる熱に安定な蛋白質である。パーキンソン病患者脳の Lewy 小体に α シヌクレイン凝集物の蓄積がみられる事から、多くの神経変性疾患と同様、異常蛋白質の蓄積と神經細胞死との関連性が注目されている。
10 α シヌクレインは生体内では特定の立体構造をとらず、natively unfolded protein family に属するとされている。

α シヌクレインは一次構造上3つの領域に分けられ、その内中央領域を構成する35アミノ酸残基が、アルツハイマー病患者脳に見られる老人斑の第二の構成成分 NAC(Non-amyloid β component of Alzheimer's disease amyloid)であり、
15 β シート形成能が高く、凝集に特に深く関わる領域である事実が示されてきた
(Ueda K, Fukushima H, Maslia E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA,
Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 1993;90
(23):11282-6., Iwai A, Yoshimoto M, Maslia E, Saitoh T., *Biochemistry*.
20 1995;34(32):10139-45., Han H, Weinreb PH, Lansbury PT Jr. *Chem Biol.*
1995 (3):163-9.)。

また、NAC領域よりも上流の位置において、家族性パーキンソン氏病にみられる遺伝性点変異、Ala50Pro および Ala53Thr によりシヌクレインの凝集が促進される事が示唆されている (Linda Narhi, Stephen J. Wood, Shirley Steavenson,
25 Yijia Jiang, Gay May Wu, Dan Anafi, Stephen A. Kaufman, Francis Martin,
Karen Sitney, Paul Denis, Jean-Claude Louis, Jette Wypych, Anja Leona
Biere, and Martin Citron, *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 9843 - 9846.,
Rochet J-C, Conway K.A, Lansbury P.T, *Biochemistry* (2000) 39, 10619-626.,
Conway K.A, Harper J.D, Lansbury P.T, *Nature Medicine* (1998) 4, 1318-1320.,
30 Li J., Uversky V. N, Fink A.L, *Biochemistry* (2001) 40, 11604-613)。しかし、これまで系統的な変異 α シヌクレイン構築に基づく蛋白質化学的解析による

同分子の凝集・線維化機構の解明は行われていない。

本発明は、野生型ヒト α シヌクレインの凝集を抑制する作用を有する変異ヒト α シヌクレインを提供することを目的とする。

5 発明の開示

本発明者は、 α シヌクレインの凝集に関与する可能性のあるアミノ酸残基を種々検討した結果、凝集形成能の低下したヒト α シヌクレイン変異体を発見することに成功して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、凝集形成能が低下している変異ヒト α シヌクレインを提供する。特に、本発明は、野生型ヒト α シヌクレインのアミノ酸配列（配列番号1）において、以下の少なくとも1つのアミノ酸残基が置換されている配列を有する、変異ヒト α シヌクレインを提供する：68番目のグリシン；69番目のアラニン；70番目のバリン；71番目のバリン；72番目のトレオニン；74番目のバリン；77番目のバリン；および82番目のバリン。

好ましくは、本発明の変異ヒト α シヌクレインは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、以下に挙げるアミノ酸置換の少なくとも1つを含有する：68番目のグリシンをトレオニンまたはバリン；69番目のアラニンをトレオニンまたはバリンまたはリジン；70番目のバリンをトレオニンまたはプロリンまたはフェニルアラニン；71番目のバリンをトレオニンまたはリジン；72番目のトレオニンをバリンまたはグルタミン酸；74番目のバリンをトレオニン；77番目のバリンをトレオニン；および82番目のバリンをリジン。また好ましくは、本発明の変異ヒト α シヌクレインは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、Ala69Lys / Val70Thr / Val71Lys / Thr72Glu の4箇所のアミノ酸残基の置換を有する。また好ましくは、本発明の変異ヒト α シヌクレインは、配列番号1に記載のアミノ酸配列において、Ala69Lys / Val70Thr / Val71Lys / Thr72Glu およびVal82Lys の5箇所のアミノ酸残基の置換を有する。

別の観点においては、本発明は、上述の本発明の変異ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子、該遺伝子を導入した組み換えプラスミド、および該組み換えプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

30 本発明はまた、変異型ヒト α シヌクレインの製造方法であって、
(a) 請求項6に記載の遺伝子をプラスミドに導入して組み換えプラスミドを調製

し、

(b) (a)の組み換えプラスミドを用いて宿主を形質転換して形質転換体を調製し；
そして

(c) (b)の形質転換体を培養して変異型ヒト α シヌクレインを産生させる，

5 の各工程からなる方法を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は、以下のアミノ酸配列：

Gln-Val-Thr-Asn-Val-Gly-Gly-Ala-Thr-Thr-Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln
(配列番号 2 2)

のうち 10 またはそれ以上の連続するアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。

10 好ましくは、本発明のペプチドは、以下のアミノ酸配列：

Val-Gly-Gly-Ala-Thr-Thr-Gly-Val-Thr (配列番号 2 3)

を有する。

また別の観点においては、本発明は、野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制するための組成物であって、上述の本発明の変異ヒト α シヌクレインまたは本発明のペプチドを含むことを特徴とする組成物を提供する。本発明はまた、細胞、組織または生物において、野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制する方法であって、細胞、組織または生物を、上述の本発明の変異ヒト α シヌクレインまたは 20 本発明のペプチドと接触させることを含む方法を提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、野生型および A53T 変異型 α シヌクレインの線維形成の時間変化を示す (WT ; 野生型 α シヌクレイン、A53T ; Ala53Thr 変異 α シヌクレイン、A30P ; 25 Ala30Pro 変異 α シヌクレイン)。

図 2 は、野生型および本発明の変異型 α シヌクレインの線維形成の時間変化を示す (WT ; 野生型 α シヌクレイン、V70T ; Val70Thr 変異 α シヌクレイン、V70P ; Val30Pro 変異 α シヌクレイン、V70T/V71T ; Val70Thr/Val71Thr 二重変異 α シヌクレイン)。

30 図 3 は、野生型および変異型 α シヌクレイン、ならびに野生型または A53T 変異型 α シヌクレインと本発明の変異型 α シヌクレインとの混合試料について、凝

集塊形成を評価したグラフである(before:初期値, after 145hr 後、WT ; 野性型、V70P ; Val70Pro 変異型、V70T/V71T ; Val70Thr/Val71Thr 二重変異、A53T ; Ala53Thr 変異、WT x V70T/V71T ; 野性型と Val70Thr/Val71Thr 二重変異との混合試料、A53T x V70T/V71T ; Ala53Thr と Val70Thr/Val71Thr 二重変異との混合試料)。

図4は、野生型および変異型 α シヌクレイン、ならびに野生型またはA53T変異型 α シヌクレインと本発明の変異型 α シヌクレインとの混合試料について、線維形成の時間変化を示すグラフである(WT x V70T/V71T : 野性型 α シヌクレインとVal70Thr/Val71Thr二重変異 α シヌクレインとの混合試料、A53T x V70T/V71T : Ala53Thr変異 α シヌクレインとVal70Thr/Val71Thr二重変異 α シヌクレインとの混合試料)。

発明の詳細な説明

本発明の変異型ヒト α シヌクレインは、野生型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子から遺伝子工学的手法を用いて製造することができる。野生型ヒト α シヌクレインのアミノ酸配列およびこれをコードする遺伝子の配列を、それぞれ配列番号1および2に示す。

これにはまず部位特異的変異法をもちいて野生型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子の変異目的部位の塩基配列を、目的とするアミノ酸残基に対応する塩基配列に変更して、変異型のヒト α シヌクレイン遺伝子を調製する。この部位特異的変異法は、野生型の遺伝子DNAが組み込まれたプラスミドの一本鎖DNAを鋸型にして、変異させようとする塩基配列を含む合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして変異型の遺伝子を合成するものであり、各種市販キットを用いて合成することができる(TAKARA Mutan express Kmなど)。

本発明においては、野生型のヒト α シヌクレイン遺伝子の一本鎖とアニーリング可能であるが置換しようとする目的部位に対応する塩基配列が相違するオリゴヌクレオチドを化学合成し、この合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、かつ該野生型のヒト α シヌクレイン遺伝子が組み込まれたプラスミドの一本鎖DNAを鋸型として、変異型のヒト α シヌクレイン遺伝子を合成することができる。

次いで、変異型ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子を発現ベクター系に挿入して、発現用宿主ベクター系を構築する。本発明において用いられる宿主とし

ては、例えば大腸菌、酵母、枯草菌などが挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

また、本発明のペプチドは、慣用の固相または液相のペプチド合成技術により製造することができる。

5 本発明の変異型ヒト α シヌクレインの凝集形成能は、アミロイドをはじめとする蛋白質凝集にともづく線維形成観測において一般的に用いられている方法により測定することができる。例えば、 α シヌクレインを約2mg/mlになるように調製して、37°Cでインキュベーションし、一定時間ごとにアリコートを採取する。この採取した試料に対して、線維構造に特異的に結合する蛍光色素チオフラビン
10 T (T f T) を終濃度25 μ Mで含む10mM Tris-HCl、pH 7.4の緩衝液溶液に加え100 μ lとして、直ちに蛍光スペクトルを観測する (Ex 440nm, Em 450-550nm)。T f Tの蛍光強度の増加を追跡することにより、線維形成速度を測定することができる。

また、本発明の変異型ヒト α シヌクレインならびに本発明のペプチドが野生型
15 α シヌクレインまたは家族性パーキンソン氏病患者で見出された2種の変異 α シヌクレイン、Ala30Pro および Ala53Thr の凝集形成を抑制する能力は、これらのヒト α シヌクレインと本発明の変異型ヒト α シヌクレインを混合した試料を用いて、上述のように線維形成速度を測定し、その変動を定量することにより測定することができる。

20 このようにして開発した変異ヒト α シヌクレインおよびペプチドを用いて、パーキンソン氏病に代表されるレビー小体が沈積する神経変性疾患であるシヌクレオパシーの進行の抑制が期待される。具体的には、本発明の変異ヒト α シヌクレインあるいはペプチドを直接患部に投与する方法、これらの構造遺伝子を含む発現ベクターにより恒常的あるいは一過性として患部で発現させる方法、さらにこれら
25 の変異ヒト α シヌクレインあるいはペプチドに Protein Transduction Domain (PTD) とよばれる細胞透過性を付与するペプチド残基を遺伝子的あるいは化学的に結合させることにより、患部近傍に投与・吸収させる方法によりその治療効果が期待される。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て
30 本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2003-202699号の明細書および図面に

記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明
5 の範囲を制限するものではない。

実施例 1

変異ヒト α シヌクレイン遺伝子の作成

ヒト α シヌクレイン遺伝子のクローニング

10 大腸菌発現ベクターとして pTYB1 を利用した。*NdeI* サイトをデザインしたプライマーと、*KpnI* サイトとインティンの構造遺伝子の塩基配列を一部含むようにデザインしたプライマーを用いて、ヒト骨髓 cDNA ライブラリー (Human Bone Marrow) に対して PCR をを行い、ヒト由来 α シヌクレインの構造遺伝子を増幅した。

15 PCR forward プライマー：
5' -CGC CAT ATG GAT GTA TTC ATG AAA GGA CTT TCA AAG G-3' (配列番号 3)
PCR reverse プライマー：
5' -GGT ACC CTT GGC AAA GCA GGC TTC AGG TTC GTA GTC TTG ATA-3' (配列番号 4)

20 PCR の反応条件は変性：95°C(1 分間)、アニーリング：55°C(1 分間)、伸長：72°C(1 分間)で 35 サイクル行った。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動にかけた後、ジーンクリーンⅡキット (Bio 101 社) を用いて DNA を精製した。これを pGEM-T にサブクローニングした。このプラスミドを大腸菌 DH5 α -MCR に形質転換し、LB/ アンピシリン (100 μ g/ml)/ IPTG (0.5 mM)/ X-Gal (80 μ g/ml) の
25 プレートにてカラーセレクションを行った。得られたホワイトコロニーを培養後、プラスミドを抽出し、DNA シークエンスの解析を行った。 α シヌクレインの構造遺伝子の挿入が確認できたプラスミドを持つコロニーを再び培養し、抽出したプラスミドを *NdeI*、*KpnI* で制限酵素消化した。得られた DNA 断片を上記同様に精製した。これを同様の制限酵素で調製した発現ベクター pTYB1 にクローニングし、
30 α シヌクレインの C 末端にインティン～キチン結合ドメインが連結された融合蛋白質を発現させるためのベクター、pTYB1/ α -syn を構築した。

このプラスミドを大腸菌 DH5 α -MCR に形質転換、培養後、プラスミドを抽出し、DNA シークエンスの解析を行い変異の入っていないことを確認した。

部位特異的変異導入

5 クローニングベクター pGEM-T に α シヌクレイン遺伝子を挿入したプラスミドに対し、*Nco*I および *Pst*I サイトをデザインしたプライマーを用いて PCR を行い、 α シヌクレイン遺伝子断片を増幅した。
PCR forward プライマー1 : *Nco*I サイトをデザインしたプライマー
5' -CCA TGG ATG TAT TCA TGA AAG GAC TTT CAA AGG CCA-3' (配列番号 5)
10 PCR reverse プライマー2 : *Pst*I サイトをデザインしたプライマー
5' -CCT GCA GTA TTT CTT AGG CTT CAG GTT CGT AGT CTT G-3' (配列番号 6)
增幅断片を TA クローニングした後、*Nco*I および *Pst*I による制限酵素消化により切り出し、同様に処理した発現用ベクター pTrc99A にライゲーションさせて pTrc99A/ α syn を作成した。このプラスミドに対し、*Hind*III-*Nde*I および *Kpn*I
15 サイトをデザインしたプライマーを用いて PCR を行い α シヌクレイン遺伝子断片を増幅した。
PCR forward プライマー3: *Hind*III-*Nde*I サイトをデザインしたプライマー
5' - CCAAGCTTCATATGGATGTATTGAAAGGACTTT- 3' (配列番号 7)
PCR reverse プライマー4: *Kpn*I サイトをデザインしたプライマー
20 5' - GGT ACC CTT GGC AAA GCA GGC TTC AGG TTC GTC TTG ATA -3' (配列番号 8)
增幅断片を TA クローニングした後、*Hind*III および *Kpn*I による制限酵素消化により切り出し、同様に処理した変異導入用ベクター pKF19k とライゲーションさせて pKF19k/ α syn を得た。これを大腸菌 DH5 α に形質転換した後にプラスミドを抽出し、遺伝子配列を確認した。以下に示す変異導入用オリゴヌクレオチドを用いて、TAKARA Mutan Super Express Km キットにより α シヌクレイン遺伝子に変異導入をおこなって、それぞれの変異体遺伝子配列を含むプラスミド（以下、pKF19k/変異 α syn と総称する）を得た。また、2 以上の変異を導入する場合には、これらのオリゴヌクレオチドを適宜組み合わせた。これを大腸菌 MV1184 株
25 30 に形質転換し、変異導入をシークエンス解析により確認した。
変異導入用オリゴヌクレオチド：

G68T 5' -CAAATGTTGGAACAGCAGTGGTGAC- 3' (配列番号 9)
 G68V 5' -CAAATGTTGGAGTGGCAGTGGTGAC- 3' (配列番号 10)
 A69T 5' -GTTGGAGGAACAGTGGTGACGGG- 3' (配列番号 11)
 A69V 5' -GTTGGAGGAGTGGTGACGGG- 3' (配列番号 12)
 5 V70T 5' -GGAGGAGCAACAGTGACGGGTG-3' (配列番号 13)
 V70P 5' -GGAGGAGCACCTGTGACGGGTG-3' (配列番号 14)
 V70F 5' -GGAGGAGCATTGTGACGGGTG-3' (配列番号 15)
 V70T/V71T
 5' -CAAATGTTGGAGGAGCAACAACAACGGGTGTGACAGCAG-3' (配列番号 16)
 10 T72V 5' -GAGCAGTGGTGGTGGGTGTGACAG-3' (配列番号 17)
 V74T 5' -GGTGACGGGTACAACAGCAGTAG-3' (配列番号 18)
 V77T 5' -GTGTGACAGCAACCAGCCCAGAAGAC-3' (配列番号 19)
 V82K 5' -CCCAGAACAGAAAAGAGGGAGCAGG-3' (配列番号 20)
 A69K / V70T / V71K / T72E
 15 5' -GTGACAAATGTTGGAGGAAAAACAAAAGAAGGTGTGACAGCAGTAGCC-3' (配列番号 21)

変異 α シヌクレイン生産用ベクターの構築

各 pKF19k/変異 α syn プラスミドを *Nde*I および *Kpn*I にて制限酵素消化し、同様に処理したインテイン融合発現ベクター pTYB1 とライゲーションさせて、それぞれの変異 α シヌクレイン生産用ベクター（以下、pTYB1/変異 α syn と総称する）を構築し、野生型と同様に大腸菌 DH5 α -MCR に形質転換した。

実施例 2

変異シヌクレインの製造

坂口フラスコを用い、450ml の LB 培地（アンピシリン終濃度 100 μ g/ml）で 25 37°C、一晩振とう培養した pTYB1/変異 α -syn をもつ大腸菌 ER2566 をファーメンター中の LB 培地（7L、エイノール（消泡剤）1ml、を含む）に植菌した。エアレーション 7L/min で、37°Cで培養を開始し、OD₆₀₀ が 0.5~0.8 に達した段階で終濃度 0.3mM となるように IPTG を添加して、インテイン～キチン結合ドメイン融合 α シヌクレインの発現を誘導した。誘導開始後、温度を 15°Cに下げ、さらに 16 時間培養を行った。培養した菌体を遠心分離（5000g、4°C、10 分）で集菌し、さらに得られた菌体を 0.85%NaCl 溶液で 2 回洗浄した。

精製方法

培養後、集菌、洗浄して得られた菌体を 20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 50mM NaCl に懸濁後、フレンチプレス (110MPa) で破碎し遠心分離 (20,000×g, 4°C, 30 分)を行った。あらかじめ 20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 500mM NaCl で平衡化しておいたキチンカラム (volume; 約 10ml) に、遠心後得られた上清を流した。その後、20mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 1M NaCl, 0.1% Tween 20 をカラムの 10 倍量使い、未吸着蛋白質を洗い流した。続いて 20mM Tris-HCl (pH 7.4) を 30ml 流しカラムの塩濃度を下げ、20mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM DTT を 30ml 流した状態で、4°C下に 16 時間放置してインテインの自己分解反応をさせた。その後、20mM Tris-HCl (pH 7.4) を 30ml 流し、得られたサンプルを 20mM Tris-HCl (pH 7.4) に対して三回透析を行い、最後に非還元 SDS-PAGE により精製の確認を行った。

実施例 3

15 CD スペクトルによる α シヌクレインの構造変化の観測

精製された α シヌクレインを約 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製して、温度変化における α シヌクレインの構造変化を CD スペクル測定により観察した。温度変化は 3-90°C で、低い温度から順に 3°C, 15°C, 25°C, 40°C, 60°C, 90°C にてスペクトルの測定を行った。また各温度において任意の時間に複数回スペクトラムを測定し、その温度における熱が十分 α シヌクレインに伝わり、構造状態が一定となっていることを確認した。そのちに、蛋白質溶液由来の CD スペクトラムとして決定した。この蛋白質溶液由来の CD スペクトルから、蛋白質が溶解している緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl) 由来の CD スペクトルを差し引き、コンピュータープログラムによりスムージングを行った。その結果、変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して凝集形成能が低下していた。

実施例 4

蛍光プローブによる構造変化の観測

精製された α シヌクレインを約 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製して、温度変化における α シヌクレインの構造変化を 20 μM チオフラビン T, または 50 μM 8-アニリノ -1-ナフタレンスルホン酸 (ANS) を加えチオフラビン T の場合は Ex 440nm,

E_{m} 450–550nm、ANS の場合は Ex 380nm、 E_{m} 400–600nm での蛍光スペクル測定により観察した。温度変化は 3–90°C で、低い温度から順に 3°C、15°C、25°C、40°C、60°C、90°C にてスペクトルの測定を行った。また各温度において任意の時間に複数回スペクトラムを測定し、その温度における熱が十分 α シヌクレインに伝わり、
5 構造状態が一定となっていることを確認した。そのうちに、蛋白質溶液由来の蛍光スペクトラムとして決定した。この蛋白質溶液由来の蛍光スペクトルから、蛋白質が溶解している緩衝液(20mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl)由来の蛍光スペクトルを差し引き、コンピュータープログラムによりスムージングを行った。
その結果、変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して凝集形成能が
10 低下されていた。

実施例 5

変異 α シヌクレインの凝集塊ならびに線維形成の解析

精製された野性型ならびに本発明にて構築した変異 α シヌクレイン、および家
15 族性パーキンソン氏病患者で見出された 2 種の変異 α シヌクレイン、Ala30Pro および Ala53Thr を約 2 mg/ml になるように調製して、37°C でインキュベーションした。一定時間ごとにそれぞれ 10 μ l ずつ採取した。この採取した試料に対して、線維構造に特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T (T f T) を終濃度 25 μ M で含む 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 の緩衝液溶液に加え 10
20 μ l として、直ちに蛍光スペクトルを観測した (Ex 440nm, E_{m} 450–550nm)。線維形成速度ならびにその量は T f T の蛍光強度の増加を指標に観測した。この方法はアミロイドをはじめとする蛋白質凝集にもとづく線維形成観測において一般的に用いられている方法である。

家族性パーキンソン氏病患者で見出された 2 種の変異 α シヌクレイン、
25 Ala30Pro および Ala53Thr は試料インキュベーション直後から、また野性型 α シヌクレインでは約 12 時間後から蛍光強度が顕著に増加し、線維形成が観測された。その後、この 3 種の α シヌクレインの線維形成は進み、蛍光強度 50 を超える多量の線維形成が観測された。その結果を図 1 に示す。これに対し、本発明により構築された変異 α シヌクレインである Val170Thr, Val170Pro および同時に
30 2箇所にアミノ酸置換が施された Val170Thr/Val171Thr は線維形成能力が低下していた。すなわち図 2 に示すように、Val170Thr, および Val170Pro 変異 α シヌク

レインの線維形成速度は野性型の約 50 %以下であった。また最終的な線維形成量は Val70Thr では野性型の約 50 %、Val70Pro では約 20 %であった。

また、V74T、V77T、V82K、ならびに A69K / V70T / V71K / T72E の 4箇所が置換された α シヌクレインおよび A69K / V70T / V71K / T72E / V82K の 5箇所が置換された α シヌクレインは、いずれも Val71Thr の線維形成能力と同程度の線維形成能力を示した。その線維形成能力は野生型 α シヌクレインの線維形成能力と比べ、速度、最終到達量は約 50 %程度であった。

さらに驚くべきことに 2箇所の変異が施された Val70Thr/Val71Thr の線維形成はほとんど観測されなかった。100 時間後の線維形成量は野性型の 10 %以下であった。このように、これらの変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して線維形成能が低下していた。

またこの実験において溶液に形成されている α シヌクレイン凝集塊の総量（線維および非線維成分の和）を溶液の濁度を 33.0 nm の散乱により計測することで評価した。その結果を図 3 に示す。野性型ではインキュベーション前に比較して凝集塊が顕著に形成されていることが観測される。さらに家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr では野性型よりも多くの凝集塊が形成されていることが観測された。これに対して、本発明により構築された変異 α シヌクレインである Val70Pro および同時に 2箇所にアミノ酸置換が施された Val70Thr/Val71Thr は凝集塊形成能力が低下していた。すわわち、
20 Val70Pro 変異 α シヌクレインの凝集塊の量は野性型の約 80 %以下であった。
さらに驚くべきことに二箇所の変異が施された Val70Thr/Val71Thr の凝集塊の量は野性型の約 15 %であった。このように、これらの変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインと比較して凝集形成能が低下していた。

25 実施例 6

変異 α シヌクレインによる野性型ならびに家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr の凝集塊および線維形成の抑制

精製された野性型ならびに本発明にて構築した 2 箇所の変異が施された Val70Thr/Val71Thr 変異 α シヌクレイン 1 mg/ml と、野性型あるいは家族性
30 パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr を 1 mg/ml になるように混合し、総蛋白質濃度 2 mg/ml に調製して、37°Cでインキュベー

ションした。一定時間ごとにそれぞれ $10 \mu l$ ずつ採取した。この採取した試料に対して、線維構造に特異的に結合する蛍光色素チオフラン T (T f T) を終濃度 $25 \mu M$ で含む $10 mM Tris-HCl$ 、pH 7.4 の緩衝液溶液に加え $100 \mu l$ として、直ちに蛍光スペクトルを観測した (Ex 440nm, Em 450-550nm)。線維形成速度ならびにその量は T f T の蛍光強度の増加を指標に観測した。

その結果、野生型 α シヌクレインおよび家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr が含まれているにもかかわらず、T f T を指標とする線維形成はほとんど観測されなかった。野性型単独でインキュベーションした場合には約 48 時間後に最大線維形成量に到達するのに対して、野性型 α シヌクレインと Val70Thr/Val71Thr を混合した試料においては、同時間ではまったく線維は形成されていなかった。100 時間のインキュベーション後においても野性型単独でインキュベーションした場合の約 15% 以下であった (図 4)。さらに家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr 単独でインキュベーションした場合にはインキュベーション直後から急激に線維が形成され、同じく 48 時間後には最大線維形成量に到達するにもかかわらず、家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr と本発明にて構築した二箇所の変異が施された Val70Thr/Val71Thr とを混合した試料においては、125 時間インキュベーション後もまったく線維は形成されていなかった。

このように、本発明にて構築した変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインおよび家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレインの線維形成を抑制することが示された。またこの実験において溶液に形成されている α シヌクレイン凝集塊の総量 (線維および非線維成分の和) を溶液の濁度を $330 nm$ の散乱により計測することで評価した (図 3)。その結果、野性型単独あるいは家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン Ala53Thr 単独では多くの凝集塊が形成されていることが観測されるのに対して、本発明にて構築した二箇所の変異が施された Val70Thr/Val71Thr と混合した試料においては、野性型および Ala53Thr のいずれと混合した系において、凝集塊の形成が大幅に減少していた。このように、本発明にて構築した変異 α シヌクレインは野生型 α シヌクレインおよび家族性パーキンソン氏病患者で見出された変異 α シヌクレイン

の凝集塊形成能力を抑制することが示された。

これは本発明によって構築された変異 α シヌクレインが、 α シヌクレインの線維および凝集塊形成によって引き起こされるパーキンソン氏病に代表される各種シヌクレオバシー神經変性疾患の有効な治療薬であること、ならびに新たな治療

5 薬の開発のための重要な分子であることを示している。

実施例 7

部分構造ペプチドによる野生型 α シヌクレインの線維形成の抑制

精製された野生型の α シヌクレイン 2 mg / ml の溶液に、NH₂-Val-Gly-
10 Gly-Ala-Thr-Thr-Thr-Gly-Val-Thr-COOH である 10 残基からなる合成 α シヌク
レイン部分構造ペプチドを 0.2 mg / ml 溶解し、37°Cでインキュベーション
した。一定時間ごとにそれぞれ 10 μ l ずつ採取した。この採取した試料に対して、線維構造に特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T (T f T) を終濃度 2
5 μ M で含む 10 mM Tris-HCl、pH 7.4 の緩衝液溶液に加え 100
15 μ l として、直ちに蛍光スペクトルを観測した (Ex 440nm, Em 450-550nm)。線
維形成速度ならびにその量は T f T の蛍光強度の増加を指標に観測した。

その結果、 α シヌクレイン部分構造ペプチドは野生型 α シヌクレインの線維形
成能力を約 20 % 低下させることができ、このペプチドが抗線維形成能力を有す
ることが示された。

20

産業上の利用性

凝集形成能が低下した本発明の変異ヒト α シヌクレインは、パーキンソン氏病
病因の検討および治療、ならびに遺伝子治療法開発研究において有用である。

請求の範囲

1. 凝集形成能が低下している変異ヒト α シヌクレイン。
2. 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、以下の少なくとも1つのアミノ酸残基が置換されている配列を有する、変異ヒト α シヌクレイン：
 - 6 8番目のグリシン；
 - 6 9番目のアラニン；
 - 7 0番目のバリン；
 - 7 1番目のバリン；
- 10 7 2番目のトレオニン；
 - 7 4番目のバリン；
 - 7 7番目のバリン；および
 - 8 2番目のバリン。
3. 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、以下に挙げるアミノ酸置換の少なくとも1つを含有する、変異ヒト α シヌクレイン：
 - 6 8番目のグリシンをトレオニンまたはバリン；
 - 6 9番目のアラニンをトレオニンまたはバリンまたはリジン；
 - 7 0番目のバリンをトレオニンまたはプロリンまたはフェニルアラニン；
 - 7 1番目のバリンをトレオニンまたはリジン；
- 20 7 2番目のトレオニンをバリンまたはグルタミン酸；
 - 7 4番目のバリンをトレオニン；
 - 7 7番目のバリンをトレオニン；および
 - 8 2番目のバリンをリジン。
4. 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、Ala69Lys / Val70Thr / Val71Lys / Thr72Glu の4箇所のアミノ酸残基の置換を有する変異ヒト α シヌクレイン。
- 25 5. 配列番号1に記載のアミノ酸配列において、Ala69Lys / Val70Thr / Val71Lys / Thr72Glu および Val82Lys の5箇所のアミノ酸残基の置換を有する変異ヒト α シヌクレイン。
- 30 6. 請求項1～5のいずれかに記載の変異ヒト α シヌクレインをコードする遺伝子。

7. 請求項 6 に記載の遺伝子を導入した組み換えプラスミド。
8. 請求項 7 に記載の組み換えプラスミドにより形質転換された形質転換体。
9. 変異型ヒト α シヌクレインの製造方法であって、
 - (a) 請求項 6 に記載の遺伝子をプラスミドに導入して組み換えプラスミドを調製し、
5 (b) (a) の組み換えプラスミドを用いて宿主を形質転換して形質転換体を調製し；そして
(c) (b) の形質転換体を培養して変異型ヒト α シヌクレインを産生させる、
の各工程からなる方法。
10. 野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制するための組成物であって、請求項 1～5 のいずれかに記載の変異ヒト α シヌクレインを含むことを特徴とする組成物。
 11. 細胞、組織または生物において、野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制する方法であって、細胞、組織または生物を、請求項 1～5 のいずれかに記載の変異ヒト α シヌクレインと接触させることを含む方法。
15
 12. 以下のアミノ酸配列：
Gln-Val-Thr-Asn-Val-Gly-Gly-Ala-Thr-Thr-Thr-Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Gln
20. のうち 10 またはそれ以上の連続するアミノ酸配列を有するペプチド。
 13. 以下のアミノ酸配列：
Val-Gly-Gly-Ala-Thr-Thr-Thr-Gly-Val-Thr
を有するペプチド。
 14. 野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制するための組成物であって、請求項 12 または 13 に記載のペプチドを含むことを特徴とする組成物。
25
 15. 細胞、組織または生物において、野生型ヒト α シヌクレイン、Ala53Thr 変異ヒト α シヌクレインまたは Ala50Pro 変異ヒト α シヌクレインの凝集を抑制する方法であって、細胞、組織または生物を、請求項 12 または 13 に記載のペ
30 プチドと接触させることを含む方法。

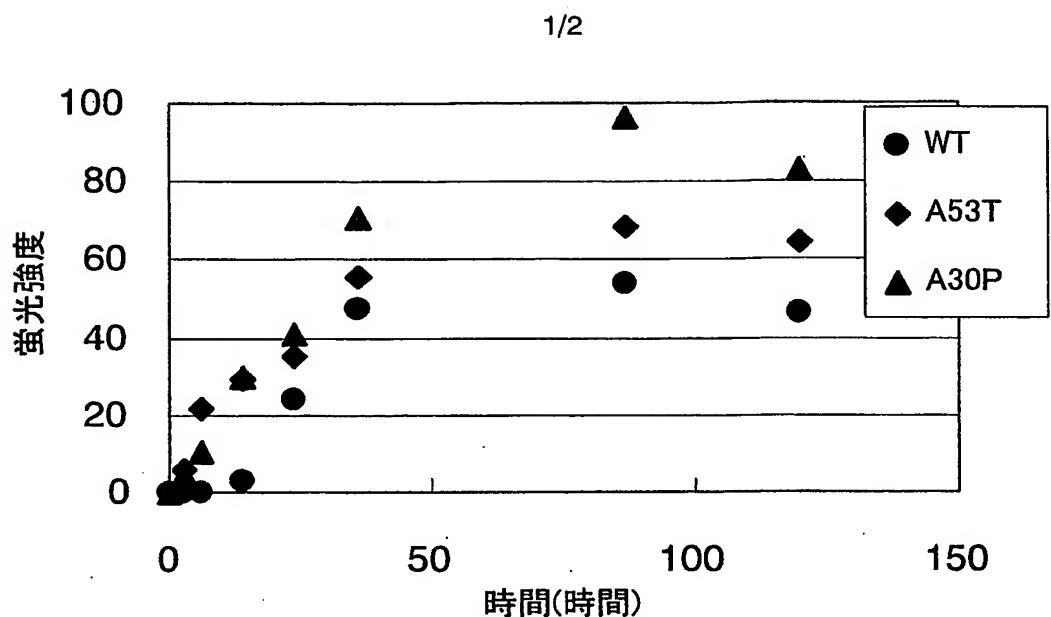


図1

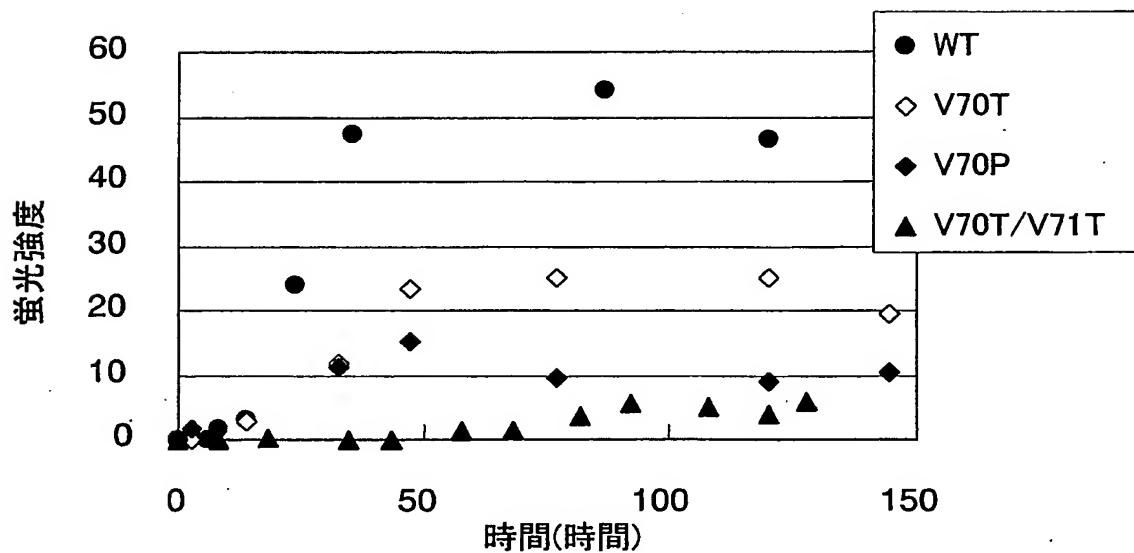


図2

2/2

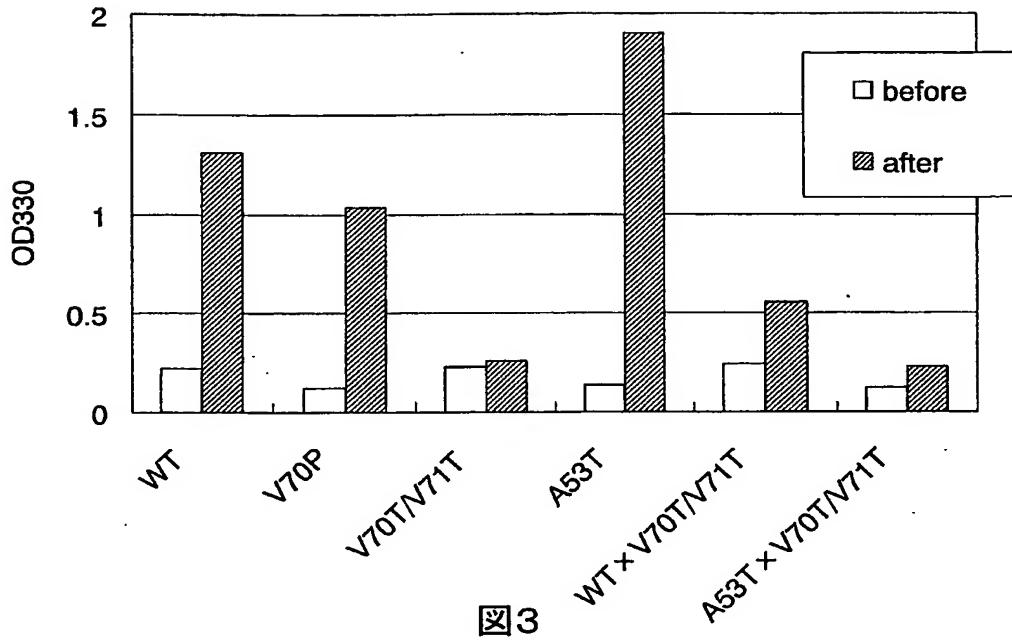


図3

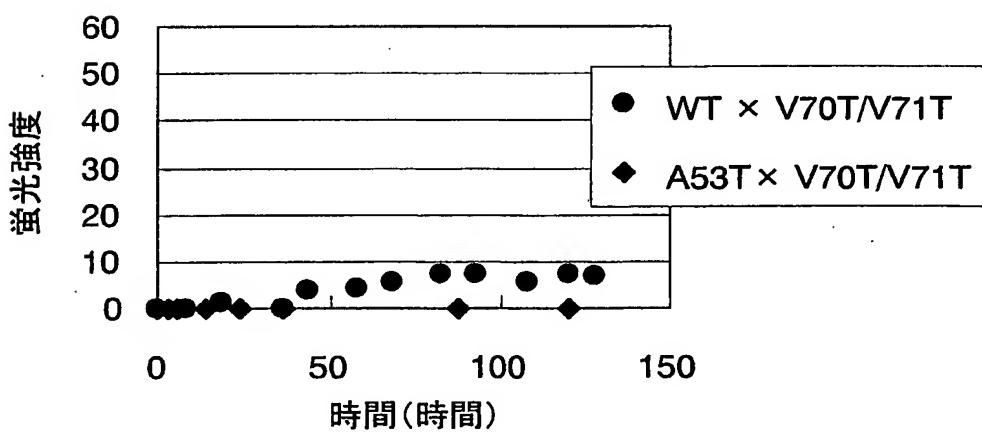


図4

1/7

SEQUENCE LISTING

<110> Sode, Koji
<120> Synuclein Mutants with Aggregation-Suppressing Activity
<130> PSD-9013WO
<150> JP 2003-202699
<151> 2003-06-22
<160> 23
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 140
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85 90 95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 2

<211> 423

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

atggatgtat tcatgaaagg actttcaaag gccaggagg gagttgtggc tgctgctgag 60
aaaacccaaac agggtgtggc agaagcagca ggaaagacaa aagagggtgt tctctatgta 120
ggctccaaaa ccaaggaggg agtggtgcat ggtgtggcaa cagtggctga gaagaccaaa 180
gagcaagtga caaatgttgg aggagcagtg gtgacgggtg tgacagcagt agcccagaag 240
acagtggagg gagcagggag cattgcagca gccactggct ttgtcaaaaa ggaccagttg 300
ggcaagaatg aagaaggagc cccacaggaa ggaattctgg aagatatgcc tgtggatcct 360
gacaatgagg cttatgaaat gccttctgag gaagggtatc aagactacga acctgaagcc 420

taa

423

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

cgcctatatgg atgtattcat gaaaggactt tcaaagg

37

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggtacccttg gcaaaggcagg cttcagggttc gtagtcttga ta

42

<210> 5

<211> 36

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 5
ccatggatgt attcatgaaa ggactttcaa aggcca 36
<210> 6
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 6
cctgcagtagt ttcttaggtc tcaggttcgt agtcttg 37
<210> 7
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 7
ccaaagcttca tatggatgta ttcattgaaag gacttt 36
<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 8
ggtacccttg gcaaaggcagg cttcaggttc gtatgtttga ta 42
<210> 9

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 9
caaatgttgg aacagcagtg gtgac 25
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 10
caaatgttgg agtggcagtg gtgac 25
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 11
gttggaggaa cagtggtgac ggg 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 12
gttggaggag tggtggtgac ggg 23

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 13
ggaggagcaa cagtgacggg tg 22
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 14
ggaggagcac ctgtgacggg tg 22
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 15
ggaggagcat ttgtgacggg tg 22
<210> 16
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 16

caa atgttgg aggagcaaca acaacgggtg tgacacgcag 39
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 17
gagcagtgg ggtgggtgtg acag 24
<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 18
ggtgacgggt acaacacgcag tag 23
<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer
<400> 19
gtgtgacagc aaccgcccg aagac 25
<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer

<400> 20

cccagaagac aaaagaggga gcagg

25

<210> 21

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

gtgacaaatg ttggagaaaa aacaaaagaa ggtgtacag cagtagcc

48

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 22

Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Val Thr Ala Val

1 5 10 15

Ala Gln

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 23

Val Gly Gly Ala Thr Thr Thr Gly Val Thr

1 5 10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2004/009084

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, C07K7/06, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, C07K7/06, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), WPIDS(STN), JSTPLUSファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	VOLLES MJ. et al., Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism., Biochemistry, 2002, Vol. 41, No. 14, p. 4595-4602	1-15
A	WO 01/60794 A2 (The Regents of the University or California) 2001.08.23 & US 2004/128706 A1	1-15

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 26. 07. 2004	国際調査報告の発送日 10. 8. 2004
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 佐久 敬 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 3037

様式PCT/ISA/210(第2ページ) (2004年1月)

BEST AVAILABLE COPY